·论著·

石见穿诱导铁死亡抑制小鼠食管癌发生发展的研究

林鑫荣[1]，贾蕾[1]，李丽峰[1]，黄鸣[1]，吴忠冰[1]，李晶[1，2*]

1.050000 河北省石家庄市，河北医科大学中西医结合学院
2.050000 河北省石家庄市，河北医科大学第四医院中医科
*通信作者：李晶，主任医师/教授/博士生导师；E-mail：lijingtiger@126.com

【摘要】 **背景** 食管癌是一种在中国乃至全球范围内常见的消化道恶性肿瘤，具有很高的发病率和致死率。石见穿（SJC）作为传统中药，其清热解毒、活血镇痛之功常用于食管癌的治疗中。药理实验研究证明，石见穿具有抗癌性，可有效治疗多种恶性肿瘤。**目的** 基于铁死亡探讨石见穿抑制C57小鼠食管原位癌发生发展的作用和机制。**方法** 2022年2月—2023年2月选取SPF级C57BL/6雌鼠90只，随机分为对照组（Control组，n=15）、单纯4NQO诱癌组（4NQO组，n=25）、4NQO+石见穿低剂量组〔4NQO/SJC（91 mg）组，n=25〕和4NQO+石见穿高剂量组〔4NQO/SJC（182 mg）组，n=25〕。采用4NQO诱导的方式进行C57小鼠食管癌原位模型的制备。观察小鼠活动情况，记录其精神状况和进食饮水情况，每隔8周分组测量小鼠体质量并进行记录。32周后进行食管组织苏木素-伊红（HE）染色和病理学分析。测定食管组织Fe^{2+}、谷胱甘肽（GSH）和丙二醛（MDA）含量，采用蛋白质印迹法检测小鼠食管组织中核受体共激活因子4（NCOA4），谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4）蛋白质的表达水平。采用Kaplan-Meier法绘制小鼠的生存曲线，生存曲线的比较采用Breslow检验。**结果** 造模8、16、24、32周4NQO组、4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组小鼠体质量低于Control组，32周4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组小鼠体质量高于4NQO组（P<0.05）。Breslow检验结果显示，4组小鼠生存曲线比较，差异有统计学意义（χ^2=9.907，P=0.019）。HE染色结果可见，4NQO组小鼠食管上皮组织呈现异常增生，细胞排列紊乱，出现角化珠等异常病理改变；与4NQO组比较，4NQO/SJC（91 mg）和4NQO/SJC（182 mg）组食管上皮组织病理学改变明显改善。4NQO组、4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组Fe^{2+}、MDA均低于Control组，GSH均高于Control组；4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组Fe^{2+}、MDA均高于4NQO组，GSH均低于4NQO组；4NQO/SJC（182 mg）组Fe^{2+}、MDA均高于4NQO/SJC（91 mg）组，GSH均低于4NQO/SJC（91 mg）组（P<0.05）。4NQO组NCOA4低于Control组、4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组，GPX4高于Control组、4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组；4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组GPX4高于Control组。**结论** 石见穿可干预食管癌的发生发展，其机制可能与NCOA4介导的铁蛋白吞噬作用相关。

【关键词】 食管癌；铁死亡；石见穿；原位癌诱导模型；谷胱甘肽过氧化物酶4；核受体共激活因子4
【中图分类号】 R 735.1 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0342

Study on the Inhibition of Esophageal Carcinoma Development in Mice by Chinese Sage Herb through Induced Ferroptosis

LIN Xinrong[1]，*JIA Lei*[1]，*Li Lifeng*[1]，*HUANG Ming*[1]，*WU Zhongbing*[1]，*LI Jing*[1，2*]
1.College of Integrated Chinese and Western Medicine，Hebei Medical University，Shijiazhuang 050011，China
2.Department of Traditional Chinese Medicine，the Fourth Hospital of Hebei Medical University，Shijiazhuang 050011，China
Corresponding author：LI Jing，Chief physician/Professor/Doctoral supervisor；E-mail：lijingtiger@126.com

【Abstract】 **Background** Esophageal carcinoma is a common malignant tumor of the gastrointestinal tract in China and even globally，with a high incidence and mortality rate. As a traditional Chinese medicine，Chinese Sage Herb（SJC）has the effects of clearing heat and detoxifying，promoting blood circulation and easing pain in the treatment of esophageal cancer. Pharmacological experimental studies have proved that SJC has anticancer properties and can effectively treat a variety of

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81973761）
引用本文：林鑫荣，贾蕾，李丽峰，等.石见穿诱导铁死亡抑制小鼠食管癌发生发展的研究［J］.中国全科医学，2023.［Epub ahead of print］.DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0342.［www.chinagp.net］
LIN X R，JIA L，LI L F，et al. Study on the inhibition of esophageal carcinoma development in mice by Chinese Sage Herb through induced ferroptosis［J］. Chinese General Practice，2023.［Epub ahead of print］.

malignant tumors. **Objective** To explore the effect and mechanism of SJC in the inhibition of carcinoma in situ esophageal cancer development of C57 mice based on ferroptosis. **Methods** Ninety SPF grade C57BL/6 female mice were selected from February 2022 to February 2023 and randomly divided into Control group（n=15），simple 4NQO-induced cancer group（4NQO group，n=25），4NQO+ low-dose SJC group〔4NQO/SJC（91 mg）group，n=25〕and 4NQO+high dose SJC group〔4NQO/SJC（182 mg）group，n=25〕. The preparation of in situ model of esophageal cancer in C57 mice was carried out using 4NQO induction. The activities of the mice were observed，their mental state，food and water intake were recorded，and the body mass of the mice was measured and recorded at 8-week intervals. Hematoxylin-eosin（HE）staining and pathological analysis of esophageal tissue were performed after 32 weeks. The contents of Fe^{2+}，glutathione（GSH）and malondialdehyde（MDA）in esophageal tissues were determined，and the expression levels of nuclear receptor coactivator 4（NCOA4）and glutathione peroxidase 4（GPX4）in esophageal tissues of mice were detected by western blot. Kaplan-Meier method was used to plot the survival curves of mice，and Breslow test was used to compare the survival curves. **Results** The body mass of mice in 4NQO group，4NQO/SJC（91 mg）group and 4NQO/SJC（182 mg）group at 8，16，24 and 32 weeks of modeling was lower than that in Control group. The body mass of 4NQO/SJC（91 mg）group and 4NQO/SJC（182 mg）group at 32 weeks was higher than that of 4NQO group（P<0.05）. The results of Breslow test showed that there was significant difference in the survival curves of mice in the four groups（χ^2=9.907，P=0.019）. The results of HE staining showed that esophageal epithelial tissue of mice in 4NQO group showed abnormal proliferation，disordered cell arrangement，and abnormal pathological changes such as keratinized beads. Compared with 4NQO group，the esophageal epithelial histopathological changes in 4NQO/SJC（91 mg）and 4NQO/SJC（182 mg）groups were significantly improved. Fe^{2+} and MDA in 4NQO，4NQO/SJC（91 mg）and 4NQO/SJC（182 mg）groups were lower than those in Control group，and GSH was higher than that in Control group. Fe^{2+} and MDA in 4NQO/SJC（91 mg）and 4NQO/SJC（182 mg）groups were higher than those in 4NQO group，and GSH was lower than that in 4NQO group. Fe^{2+} and MDA in 4NQO/SJC（182 mg）group were higher than those in 4NQO/SJC（91 mg）group，and GSH in 4NQO/SJC（91 mg）group was lower than that in 4NQO/SJC（91 mg）group（P<0.05）. NCOA4 in 4NQO group was lower than that in Control group，4NQO/SJC（91 mg）group and 4NQO/SJC（182 mg）group，and GPX4 was higher than that in Control group，4NQO/SJC（91 mg）group and 4NQO/SJC（182 mg）group. The GPX4 of 4NQO/SJC（91 mg）group and 4NQO/SJC（182 mg）group was higher than that of Control group. **Conclusion** It is proved that SJC can interfere with the development of esophageal cancer development by a mechanism that may be related to NCOA4-mediated ferritin phagocytosis.

【Key words】 Esophageal carcinoma；Ferroptosis；Salvia chinensia；Benth；Induction of carcinoma in situ；Glutathione peroxidase 4；Nuclear receptor coactivator 4

食管癌是一种发生于全球范围内的消化道恶性肿瘤，2020 年统计结果显示，食管癌在癌症总发病率中排名第 8 位，总致死率高居全球第 6 位[1]。食管癌发病隐匿，往往初次诊断便已经是中晚期水平，因此治疗效果欠佳，预后差。在饮食、情志等因素影响下，食管癌的患病率仍在逐年增高[2]。现阶段临床上主要治疗措施有手术、化疗、分子靶向治疗等，皆存在不良反应。传统中医药治疗以其增强疗效且降低副作用的优势，被广泛应用于临床当中。

石见穿，以紫参的全草入药，其味辛、苦，性微寒，以其清利湿热，活血化瘀之功，用于噎膈、痰喘、痈肿、瘰疬等多种疾病的治疗。《类证制裁》中记载，“气滞成噎者，宣理气隧，宜用石见穿。”近年来，许多药理实验证实石见穿及其提取物具有抗癌作用[3]，其具体机制仍需进一步探究。

铁死亡是近年来被提出的一种程序性细胞死亡形式，以铁依赖性脂质活性氧的积累作为主要特征[4]。诸多证据表明，铁死亡作用于癌症的靶点众多，可为临床提供新的诊治思路[5-6]。因此，本研究旨在观察石见穿干预 4- 硝基喹啉 1- 氧化物（4NQO）诱导的 C57BL/6 小鼠原位食管癌的作用和机制，为石见穿在食管癌治疗中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2022 年 2 月—2023 年 2 月选取 SPF 级 C57BL/6 雌鼠 90 只，体质量 14~17 g，鼠龄 35~41 d。小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，均饲养于河北医科大学中西医结合学院动物中心，实验前 12 h/12 h 光暗循环适应性饲养 1 周。所有实验方法按照河北医科大学第四医院动物伦理委员会的指导方针进行（审核号：IACUC-4th Hos Hebmu-2022003）。

1.2 药物和试剂

石见穿（SJC）颗粒剂（江阴药业，货号：19092701），4NQO（sigma，货号：N8141）；丙二醛（MDA）测定试剂盒、还原型谷胱甘肽（GSH）测定试剂盒、组

织铁测定试剂盒（南京建成，货号：A003-1-1、A006-1-1、A039-2-1）；谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4）抗体（Proteintech，货号：67763-1-Ig），核受体共激活因子4（NCOA4）（abcam，货号：ab86707）。

1.3 实验仪器

4℃/-20℃冰箱（日本Sanyo），-80℃低温冰箱（日本Sanyo），数字天平TD6001型（美国sigma），正置显微镜（BX63，日本Olympus），脱水机、包埋机、冻台（武汉俊杰），病理切片机（上海徕卡），组织摊片机（金华科迪），微波炉（格兰仕）。

1.4 实验方法

1.4.1 诱癌剂制备：参照4NQO诱导小鼠原位食管癌模型法[7]，将诱癌剂4NQO溶解于1，2-丙二醇中，配制浓度为2%的母液，于-20 ℃冰箱中保存，使用时用纯净水稀释成浓度为0.1 g/L的工作液。

1.4.2 分组和给药：90只C57BL/6小鼠，适应性饲养1周后，随机分为对照组（Control组，n=15）、单纯4NQO诱癌组（4NQO组，n=25）、4NQO+石见穿低剂量组〔4NQO/SJC（91 mg）组，n=25〕和4NQO+石见穿高剂量组〔4NQO/SJC（182 mg）组，n=25〕。除Control组外，其余各组小鼠均予浓度为0.1 g/L的4NQO溶液自由饮用，16周后均改用普通饮用水；所有小鼠给予普通饲料，4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组小鼠第8周开始给予混入石见穿颗粒的饲料，饲料干预至32周。参考石见穿临床给药剂量30~60 g（人平均体质量60 kg，鼠平均体质量20 g，换算系数9.1 ：1[8]），4NQO/SJC（91 mg）组的每日给药剂量为91 mg，4NQO/SJC（182 mg）组的每日给药剂量为182 mg。

1.4.3 小鼠一般情况与体质量测定：观察小鼠活动情况，记录其精神状况和进食饮水情况，每隔8周分组测量小鼠体质量并进行记录。

1.4.4 组织处理：32周后，0.3%戊巴比妥钠0.05 mL/g过量麻醉处死小鼠，剥离取出食管组织并肉眼检查。将食管组织平铺固定于防静电橡胶板上，检查其表面是否光滑或明显增粗，有无凹凸不平或小结节，拍照记录后将组织固定、脱水、透明、包埋，最终切为厚度4 μm的薄片。

1.4.5 食管组织苏木素-伊红（HE）染色和病理学分析：脱蜡水化后，将切片依次进行苏木素染色和伊红染色，脱水透明，中性树胶封片，在光学显微镜下观察食管组织的病理变化，由2位病理学专业人员独立判断，若2位专家意见不同，由第3位专家进行判断。可观察到的病理组织结构有正常上皮、轻度异型增生、重度异型增生与鳞状细胞癌。

1.4.6 取部分食管组织准确称量，按重量（g）：体积（mL）=1 ：9加入0.9%氯化钠溶液，剪碎匀浆，离心10 min（离心半径8.5 cm，转速2 500 r/min），取上清液待测。检测时按照试剂盒说明书操作，在520 nm处测定吸光度值，按照说明书公式计算出食管组织中的Fe^{2+}浓度。取上述上清液，按说明书配置不同比例的工作液，按顺序依次加入混合，在532 nm处检测MDA吸光度值，在405 nm处检测GSH吸光度值，按照说明书公式分别计算待测样本中MDA和GSH的含量。

1.4.7 蛋白质印迹法（Western blot）检测食管组织NCOA4、GPX4蛋白表达：取材后分别提取各组小鼠的食管组织蛋白，用BCA试剂盒检测蛋白质浓度，上样、电泳、转膜、封闭、洗膜后，用一抗及荧光二抗对其进行孵育，Odyssey检测仪显影。以β肌动蛋白（β-actin）为内参，采用Image J软件计算NCOA4、GPX4的蛋白相对表达水平。

1.3 统计学方法

采用SPSS 27.0统计学软件进行数据分析，符合正态分布的计量资料采用（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验，等级资料采用秩和检验。采用Kaplan-Meier法绘制小鼠的生存曲线，生存曲线的比较采用Breslow检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组小鼠一般情况、体质量、生存率比较

实验开始8周内各组小鼠一般情况无明显差异，16周经4NQO处理小鼠较Control组活动减弱，精神萎靡。其中，4NQO/SJC（91 mg）与4NQO/SJC（182 mg）组小鼠相较于单纯4NQO诱癌组更为活跃，精神较好。

4组小鼠造模0周体质量比较，差异无统计学意义（P>0.05），造模8、16、24、32周体质量比较，差异有统计学意义（P<0.05）。组间比较结果显示，造模8、16、24、32周4NQO组、4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组小鼠体质量低于Control组，32周4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组小鼠体质量高于4NQO组，差异均有统计学意义（P<0.05），见表1。

Breslow检验结果显示，4组小鼠生存曲线比较，差异有统计学意义（χ^2=9.907，P=0.019），其中Control组生存率为100%，Control组生存率为56%，4NQO/SJC（91 mg）组生存率为76%，4NQO/SJC（182 mg）组生存率为80%，见图1。

3.2 4组小鼠食管大体形态观察

Control组小鼠食管管壁平滑，弹性充足，4NQO组小鼠食管管壁有明显增粗现象，弹性较差，多见大小不等结节，尤其在食管中下段最为常见，4NQO/SJC（91

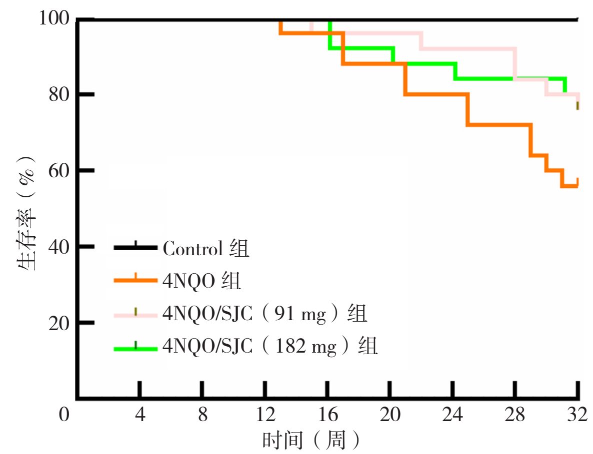
表 1 4 组小鼠体质量变化情况（g）

Table 1 Changes of body mass in 4 groups of mice

分组	只数	0 周	8 周	16 周 a	24 周 a	32 周 a
Control 组	15	15.47 ± 0.49	17.24 ± 0.53	19.06 ± 0.75	23.12 ± 0.94	29.44 ± 1.91
4NQO 组	25	15.56 ± 0.43	16.90 ± 0.35[b]	16.08 ± 3.37[b]	14.67 ± 4.93[b]	12.13 ± 6.76[b]
4NQO/SJC（91 mg）组	25	15.46 ± 0.56	16.77 ± 0.44[b]	15.58 ± 3.28[b]	15.50 ± 3.53[b]	16.28 ± 5.86[bc]
4NQO/SJC（182 mg）组	25	15.49 ± 0.79	16.66 ± 0.69[b]	14.72 ± 4.46[b]	15.65 ± 3.62[b]	17.15 ± 4.35[bc]
F 值		0.116	4.269	5.228	18.699	33.228
P 值		0.951	0.007	0.002	<0.001	<0.001

注：4NQO= 核受体共激活因子 4，Control 组 = 对照组，4NQO 组 = 单纯 4NQO 诱癌组 4NQO/SJC（91 mg）组 =4NQO+ 石见穿低剂量组，4NQO/SJC（91 mg）组 =4NQO+ 石见穿高剂量组；[a] 表示小鼠存在缺失，[b] 表示与 Control 组比较 $P<0.05$，[c] 表示与 4NQO 组比较 $P<0.05$，[d] 表示与 4NQO/SJC（0.91 g）组比较 $P<0.05$。

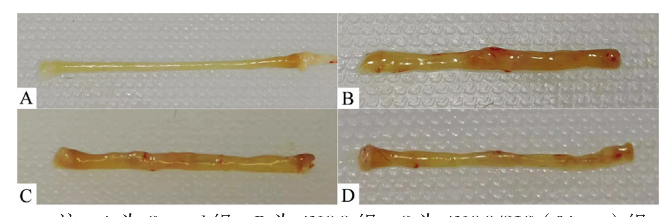
mg）组和 4NQO/SJC（182 mg）组小鼠食管变化介于上述两组之间，较 4NQO 组食管光滑细润，结节数量相对较少，见图 2。



注：Control 组 = 对照组，4NQO 组 = 单纯 4NQO 诱癌组，4NQO/SJC（91 mg）组 =4NQO+ 石见穿低剂量组，4NQO/SJC（91 mg）组 =4NQO+ 石见穿高剂量组

图 1 实验周期内小鼠 Kaplan-Meier 生存曲线

Figure 1 Kaplan Meier survival curve of mice during the experimental cycle



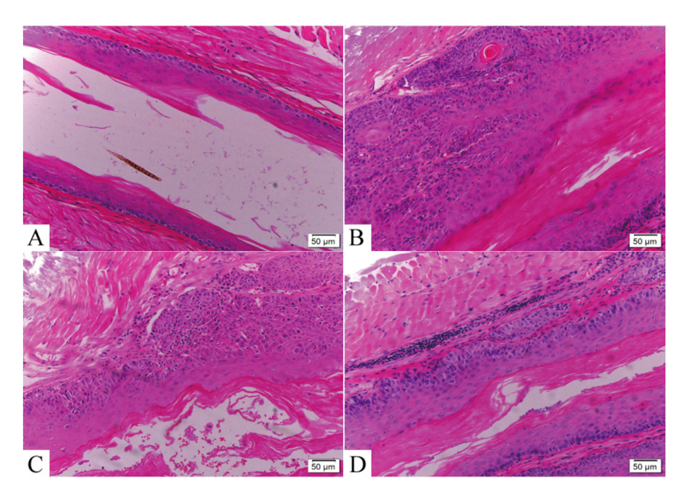
注：A 为 Control 组，B 为 4NQO 组，C 为 4NQO/SJC（91 mg）组，D 为 4NQO/SJC（182 mg）组。

图 2 4 组小鼠食管大体形态

Figure 2 Gross morphology of esophagus in 4 groups of mice

3.3 4 组小鼠食管组织 HE 染色及病理学分析结果

HE 染色可使细胞核与胞质内核酸染成蓝色，细胞质与细胞外基质染成红色。染色结果可见，Control 组小鼠食管组织未发现异常病理改变，上皮组织基底层完整，上皮层薄厚适度，细胞排列整齐；4NQO 组小鼠食管上皮组织呈现异常增生，细胞排列紊乱，出现角化珠等异常病理改变；与 4NQO 组比较，4NQO/SJC（91 mg）和 4NQO/SJC（182 mg）组食管上皮组织病理学改变明显改善，其中 4NQO/SJC（182 mg）组病变水平较 4NQO/SJC（91 mg）低，见图 3。



注：A 为 Control 组，B 为 4NQO 组，C 为 4NQO/SJC（91 mg）组，D 为 4NQO/SJC（182 mg）组。

图 3 4 组小鼠食管上皮组织 HE 染色结果（×200）

Figure 3 HE staining results of esophageal epithelial tissues in 4 groups of mice

病理结果表明，32 周后 Control 组小鼠食管未发现明显病理组织改变；4NQO 组小鼠（$n=14$）有 14.3%（2/14）组织标本出现轻度异型增生，35.7%（5/14）组织标本出现中度异型增生，50.0%（7/14）样本出现鳞状细胞癌；4NQO/SJC（91 mg）组小鼠（$n=19$）有 31.6%（6/19）组织标本出现轻度异型增生，有 42.1%（8/19）组织标本出现重度异型增生，有 26.3%（5/19）组织标本出现鳞状细胞癌；4NQO/SJC（182 mg）组小鼠（$n=20$）有 45.0%（9/20）组织标本出现轻度异型增生，40.0%（8/20）组织标本出现重度异型增生，15.0%（3/20）组织标本出现鳞状细胞癌。3 组小鼠病理结果分型比较，差异有统计学意义（$P<0.001$）。

3.4 4 组小鼠食管组织 Fe^{2+}、GSH 和 MDA 含量比较

4 组小鼠食管组织 Fe^{2+}、GSH 和 MDA 含量比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中 4NQO 组、4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组 Fe^{2+}、MDA 均低于 Control 组，GSH 均高于 Control 组；4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组 Fe^{2+}、MDA 均高于 4NQO 组，GSH 均低于 4NQO 组；4NQO/SJC（182 mg）组 Fe^{2+}、MDA 均高于 4NQO/SJC（91 mg）组，GSH 均低于 4NQO/SJC（91 mg）组，见表 2。

表 2 4 组小鼠食管组织 Fe^{2+}、GSH 和 MDA 含量比较结果（mg/g）
Table 2 Comparison of Fe^{2+}, GSH and MDA contents in esophageal tissues of mice in 4 groups

分组	只数	Fe^{2+}	GSH	MDA
Control 组	15	1.34 ± 0.06	2.38 ± 0.06	0.36 ± 0.04
4NQO 组	14	0.49 ± 0.10^a	8.35 ± 0.08^a	0.18 ± 0.01^a
4NQO/SJC（91 mg）组	19	1.08 ± 0.05^{ab}	6.11 ± 0.22^{ab}	0.28 ± 0.02^{ab}
4NQO/SJC（182 mg）组	20	1.21 ± 0.04^{abc}	2.90 ± 0.23^{abc}	0.32 ± 0.04^b
F 值		99.246	384.764	19.491
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注：GSH= 谷胱甘肽，MDA= 丙二醛；^{a} 表示与 Control 组比较 $P<0.05$，^{b} 表示与 4NQO 组比较 $P<0.05$，^{c} 表示与 4NQO/SJC（91 mg）组比较 $P<0.05$。

3.5 4 组小鼠食管组织 NCOA4、GPX4 蛋白表达水平

4 组小鼠食管组织 NCOA4、GPX4 蛋白表达水平比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。组间比较结果显示，4NQO 组 NCOA4 低于 Control 组、4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组，GPX4 高于 Control 组、4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组；4NQO/SJC（91 mg）组、4NQO/SJC（182 mg）组 GPX4 高于 Control 组，差异均有统计学意义（$P<0.05$），见表 3、图 4。

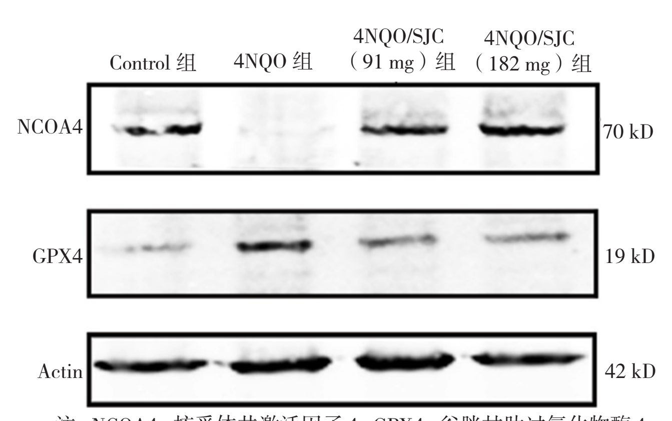
表 3 4 组小鼠食管组织 NCOA4、GPX4 蛋白相对表达量
Table 3 The protein expression levels of NCOA4 and GPX4 in esophageal tissues of four groups of mice

分组	只数	NCOA4	GPX4
Control 组	15	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.11
4NQO 组	14	0.42 ± 0.22^a	1.91 ± 0.26^a
4NQO/SJC（91 mg）组	19	1.05 ± 0.03^b	1.56 ± 0.10^{ab}
4NQO/SJC（182 mg）组	20	1.22 ± 0.19^b	1.33 ± 0.15^{ab}
F 值		13.735	20.289
P 值		0.002	<0.001

注：NCOA4= 核受体共激活因子 4，GPX4= 谷胱甘肽过氧化物酶 4；^{a} 表示与 Control 组比较 $P<0.05$，^{b} 表示与 4NQO 组比较 $P<0.05$，^{c} 表示与 4NQO/SJC（91 mg）组比较 $P<0.05$。

3 讨论

食管癌在中医上谓之“噎膈”，历代医家各有论述。作为传统用于治疗噎膈的药物，石见穿以其清热解毒、消肿散结之功被沿用至今。研究表明，石见穿及其提取物具有十分显著的抗癌效果，对乳腺癌、肝癌等多种恶性肿瘤均疗效显著[9-11]。本团队前期研究已经证实石见穿通过腺苷酸活化蛋白激酶/Unc-51 样激酶 1（AMPK/ULK1）信号通路诱导食管癌细胞发生自噬[12]。在本研究发现 4NQO 组小鼠相较 Control 组小鼠食管增粗，表面凹凸不平，出现大小不等结节，组织恶性病理改变表明小鼠原位食管癌模型诱导成功。而与 4NQO 组比较，不同剂量石见穿干预后小鼠的食管变细，结节减少，病理改变程度减轻，并且生存率明显提高。这表明石见穿的干预可以显著抑制小鼠原位食管癌的进展。



注：NCOA4= 核受体共激活因子 4，GPX4= 谷胱甘肽过氧化物酶 4。
图 4 蛋白质免疫印迹法测各组小鼠食管组织 GPX4、NCOA4 和 actin 蛋白的表达情况
Figure 4 Expression levels of GPX4, NCOA4 and actin proteins in esophageal tissues of mice in four groups measured by western blot

铁死亡的过程始于游离 Fe^{2+} 的积累[13]。Fe^{2+} 激活芬顿反应释放自由基，驱动脂质过氧化，破坏细胞结构并循环激活芬顿反应，释放出大量的活性氧，引起细胞死亡[14，15]。随着铁死亡的进展，过氧化脂质逐渐分解为一系列复杂的化合物，如 MDA。而在此过程中，GSH 发挥抗氧化作用，可中和过氧化脂质并保护膜的流动性，从而保护细胞和膜免受过氧化，常作为抗氧化指标被检测[16]。总之，Fe^{2+}、MDA、GSH 是铁死亡的重要标志物。本研究发现，在小鼠食管组织中，相较于 4NQO 组，石见穿干预的小鼠食管组织中 Fe^{2+} 和 MDA 含量明显升高，GSH 含量明显降低。提示石见穿可通过促进铁离子堆积和降低过氧化水平发挥诱导食管癌铁死亡发生的作用。

作为一种新型死亡方式，铁死亡的发生与多个细胞代谢调控系统密切相关，其中涉及铁代谢紊乱、氨基酸抗氧化失衡和脂质过氧化物积累等[17]。其中，NCOA4 是铁死亡的关键调节因子，主要通过介导铁蛋白吞噬发挥作用。铁蛋白被降解，释放出游离铁，引起大量铁蓄积最终导致铁死亡[18]。而 GPX4 协同 GSH 发挥抗氧化

作用，阻碍细胞内活性氧的生成，抑制肿瘤细胞铁死亡的发生[19]。本实验中选择 NCOA4 和 GPX4 两个蛋白作为参考指标，与 4NQO 组相比，石见穿干预的小鼠食管组织内 NCOA4 蛋白表达量增加，GPX4 蛋白表达量降低，说明石见穿促进了小鼠食管肿瘤细胞铁死亡的发生，其机制可能与 NCOA4、GPX4 有关。

目前，食管癌发病机制尚未完全明确。因此，中药以其多成分、多靶点的特征在其防治过程中作用巨大，但同时也导致了相关作用机制不明等问题。本研究为石见穿治疗食管癌提供了理论依据，为其作用机制的探究提供了新的思路。

作者贡献：李晶提出研究思路、负责文章的质量控制，对论文负责；林鑫荣设计研究方案、进行文章的构思与设计，论文撰写；林鑫荣，贾蕾，李丽峰负责试验实施、样本收集及检测；黄鸣、吴忠冰收集整理数据，进行统计学分析。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] LIU C Q，MA Y L，QIN Q，et al. Epidemiology of esophageal cancer in 2020 and projections to 2030 and 2040 [J]. Thorac Cancer，2022，14：3-11. DOI：10.1111/1759-7714.14745.

[2] UHLENHOPP D J，THEN E O，SUNKARA T，et al. Epidemiology of esophageal cancer：update in global trends，etiology and risk factors [J]. Clin J Gastroenterol，2020，13（6）：1010-1021. DOI：10.1007/s12328-020-01237-x.

[3] 刘媛，钱荣康，钱荣华. 石见穿及其提取物抗肿瘤的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志，2018，27（30）：3417-3420. DOI：10.3969/j.issn.1008-8849.2018.30.034.

[4] SHI L，LIU Y Q，LI M H，et al. Emerging roles of ferroptosis in the tumor immune landscape：from danger signals to anti-tumor immunity [J]. Febs J，2022，289（13）：3655-3665. DOI：10.1111/febs.16034.

[5] HASSANNIA B，VANDENABEELE P，VANDEN BERGHE T. Targeting ferroptosis to iron out cancer [J]. Cancer Cell，2019，35（6）：830-849. DOI：10.1016/j.ccell.2019.04.002.

[6] XU G X，WANG H，LI X L，et al. Recent progress on targeting ferroptosis for cancer therapy [J]. Biochem Pharmacol，2021，190：114584. DOI：10.1016/j.bcp.2021.114584.

[7] 吴忠冰. 基于“甘润濡养”法探讨启膈方在食管癌发生和转移中的作用 [D]. 石家庄：河北医科大学，2022.

[8] 李麦嘉. 酸枣仁汤对间氯苯哌嗪诱导焦虑模型小鼠的干预作用及机制研究 [D]. 济南：山东中医药大学，2022.

[9] WANG K N，HU Y，HAN L L，et al. Salvia chinensis benth inhibits triple-negative breast cancer progression by inducing the DNA damage pathway. Front Oncol. 2022，12：882784. DOI：10.3389/fonc.2022.882784.

[10] WANG N，TAN H Y，CHAN Y T，et al. Identification of WT1 as determinant of heptatocellular carcinoma and its inhibition by Chinese herbal medicine Salvia chinensis Benth and its active ingredient protocatechualdehyde [J]. Oncotarget，2017，8（62）：105848-105859. DOI：10.18632/oncotarget.22406.

[11] 梁伟，王松坡. 石见穿的药用成份及在抗肿瘤方面的研究 [J]. 现代肿瘤医学，2014，22（10）：2492-2494. DOI：10.3969/j.issn.1672-4992.2014.10.74.

[12] JIA L，LIN X R，GUO W Y，et al. Salvia chinensia Benth induces autophagy in esophageal cancer cells via AMPK/ULK1 signaling pathway [J]. Front Pharmacol，2022，13：995344. DOI：10.3389/fphar.2022.995344.

[13] ZHANG J J，DU J，KONG N，et al. Mechanisms and pharmacological applications of ferroptosis：a narrative review [J]. Ann Transl Med，2021，9（19）：1503. DOI：10.21037/atm-21-1595.

[14] JIANG X J，STOCKWELL B R，CONRAD M. Ferroptosis：mechanisms，biology and role in disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2021，22（4）：266-282. DOI：10.1038/s41580-020-00324-8.

[15] WANG D. Progress in the study of ferroptosis in cancer treatment：state-of-the-Art [J]. Chem Biol Interact，2023，371：110348. DOI：10.1016/j.cbi.2023.110348.

[16] LI D X，ZHANG M L，CHAO H T. Significance of glutathione peroxidase 4 and intracellular iron level in ovarian cancer cells-utilization of ferroptosis mechanism [J]. Inflamm Res，2021，70（10/11/12）：1177-1189. DOI：10.1007/s00011-021-01495-6.

[17] CHEN X，KANG R，KROEMER G，et al. Ferroptosis in infection，inflammation，and immunity [J]. J Exp Med，2021，218（6）：e20210518. DOI：10.1084/jem.20210518.

[18] GAO M H，MONIAN P，PAN Q H，et al. Ferroptosis is an autophagic cell death process. Cell Res. 2016，26（9）：1021-1032. DOI：10.1038/cr.2016.95.

[19] XIA X J，FAN X P，ZHAO M Y，et al. The relationship between ferroptosis and tumors：a novel landscape for therapeutic approach [J]. Curr Gene Ther，2019，19（2）：117-124. DOI：10.2174/1566523219666190628152137.

（收稿日期：2023-04-03；修回日期：2023-07-21）

（本文编辑：邹琳）